

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
3. Mai 2001 (03.05.2001)

PCT

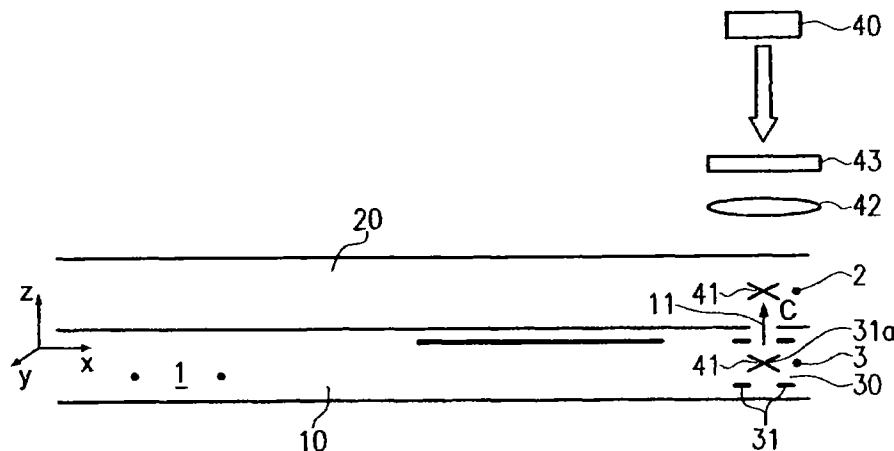
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/31315 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 15/14, (72) Erfinder; und
H05H 3/04, B03C 5/02 (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GÜNTHER, Rolf
[DE/DE]; Simon-von-Utrecht-Strasse 65, 20359 Hamburg
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/10586 (DE). GRADL, Gabriele [DE/DE]; Thomasiusstrasse 8,
10557 Berlin (DE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 27. Oktober 2000 (27.10.2000) (74) Anwalt: HERTZ, Oliver; v. Bezold & Sozien,
Akademiestrasse 7, 80799 München (DE).
(25) Einreichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).
(30) Angaben zur Priorität: 199 52 322.3 29. Oktober 1999 (29.10.1999) DE
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): EVOTEC BIOSYSTEMS AG [DE/DE]; Schnackenburgallee 114, 22525 Hamburg (DE).
Veröffentlicht:
Mit internationalem Recherchenbericht.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR PARTICLE SEPARATION

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR PARTIKELTRENNUNG



(57) Abstract: The invention relates to methods and devices for particle separation, according to which, in a fluidic microsystem consisting of a particle mixture (1), target particles (2) with predetermined characteristics are separated from residual particles (3) in a plurality of particles. Said procedure consists of the following steps: the particles of the particle mixture (1) are positioned in observation fields on functional elements (30) in at least a first receiving structure (10) of the microsystem (100). the functional elements being configured to hold the particles at least temporarily; the particles are measured in the observation fields in order to determine the particle characteristics and the observation fields which contain the target particles (2) or the residual particles (3) are recorded; optical cages are created on the observation fields which contain the target or residual particles using at least one light modulator that allows at least one optical cage to be switched on or off and the target or residual particles are simultaneously or successively transferred from their respective observation fields into at least a second receiving structure (20) of the microsystem, with optical forces of the optical cages interacting with forces of the functional elements (30).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/31315 A1



Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Es werden Verfahren und Vorrichtungen zur Partikeltrennung beschrieben, wobei in einem fluidischen Mikrosystem aus einem Partikelgemisch (1) aus einer Vielzahl von Partikeln Zielpartikel (2) mit vorbestimmten Partikeleigenschaften von Restpartikeln (3) getrennt werden, mit den Schritten: Positionieren von Partikeln des Partikelgemisches (1) in Beobachtungsfeldern an Funktionselementen (30) in mindestens einer ersten Aufnahmestruktur (10) des Mikrosystems (100), wobei die Funktionselemente dazu eingerichtet sind, die Partikel zumindest zeitweilig zu halten. Vermessen der Partikel in den Beobachtungsfeldern zur Ermittlung der Partikeleigenschaften und Erfassen der Beobachtungsfelder, die die Zielpartikel (2) oder die Restpartikel (3) enthalten, Ausbilden optischer Käfige an den Beobachtungsfeldern, die die Ziel- oder Restpartikel enthalten, unter Verwendung mindestens eines Lichtmodulators, mit dem mindestens ein optischer Käfig ein- oder ausgeschaltet werden kann, und gleichzeitiges oder sukzessives Übertragen der Ziel- oder Restpartikel von ihren jeweiligen Beobachtungsfeldern in mindestens eine zweite Aufnahmestruktur (20) des Mikrosystems, wobei optische Kräfte der optischen Käfige und Kräfte der Funktionselemente (30) zusammenwirken.

Verfahren und Vorrichtung zur Partikeltrennung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Trennen von Partikelgemischen nach bestimmten Partikeleigenschaften, insbesondere ein Trennverfahren für Gemische mikroskopisch kleiner Partikel in fluidischen Mikrosystemen, und eine Trenneinrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

Eine häufig bei biologischen oder medizinischen Untersuchungen, in der Diagnostik sowie in biotechnologischen Prozessen gestellte Aufgabe besteht in der Trennung von Suspensionsgemischen durch Verteilung oder Sortierung von Zellen oder Mikropartikeln aus einer großen Ausgangsmenge in bestimmte Gruppen mit jeweils den gleichen Eigenschaften. Beispielsweise kann die Transfektion einer Zelllinie oft nur unvollständig durchgeführt werden, so daß vor einer weiteren Bearbeitung oder Nutzung dieser Zelllinie die erfolgreich transfizierten Zellen von den nicht erfolgreich bearbeiteten Zellen getrennt werden müssen. Insbesondere das Aussortieren selten vorkommender Individuen stellt eine sehr hohe Anforderung an das Trennverfahren hinsichtlich der Reinheit und Homogenität der Zielfraktion. Ein weiteres Beispiel im medizinischen Bereich ist mit der Knochenmarktransplantation gegeben, bei der Stammzellen von einer großen Zahl anderer Zellen getrennt werden müssen. Auch bei der Analyse von fetalen Zellen im mütterlichen Blut müssen einige wenige fetale Zellen von dem Zellengemisch abgetrennt werden, das sich im mütterlichen Blut befindet. Eine wichtige Aufgabe in der Tumordiagnostik ist die Erkennung, das Aussortieren und die Analyse von metastasierenden Krebszellen im Blut des Patienten. Es sind verschiedene Methoden zur Trennung von Zellgemischen bekannt, die die Trennaufgabe jedoch nur unvollkommen lösen. Hierzu zählen insbesondere die Affinitätschromatographie, Trennverfahren

auf der Basis von Fluoreszenzmarkierungen wie zum Beispiel die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS), auf der Basis von Markierung mit ferromagnetischen Partikeln, die Magnet-aktivierte Zellsortierung (MACS) und mikroskopische Verfahren.

Die Affinitätschromatographie wie auch die MACS (oder: Panning-Verfahren) sind auf Trennvorgänge beschränkt, bei denen die Zellen an der Zelloberfläche ein Molekül exprimieren, das eine Affinität zu einer weiteren, bekannten oder unbekannten Substanz besitzt. Bei der Affinitätschromatographie wird diese Substanz auf eine Chromatographiematrix, zum Beispiel auf der Basis von Beads, aufgebracht. Eine Suspension der zu trennenden Zellen wird über diese Matrix gegeben, so daß die exprimierenden Zellen daran haften, während die anderen Zellen fort gespült werden. Der Nachteil dieses Verfahrens besteht neben der Beschränkung auf zelluläre Systeme mit einer Oberflächenexpression von Molekülen, in der hohen mechanischen Belastung der Zellen und der geringen Trennschärfe der Chromatographie. Die Trennschärfe ist schwach, da viele Zellen mit geringer Affinität unspezifisch an der Matrix hängenbleiben, die eigentlich nicht zu den abzutrennenden Zellen gehören. In der Praxis ist die Affinitätschromatographie auf die Trennung von mechanisch wenig empfindlichen Bakterien beschränkt.

Beim Magnet-aktivierten Trennen von Zellen wird die Zellsuspension mit mikrometergroßen Magnetpartikeln, auf die die affine Substanz aufgebracht ist, gemischt und die Magnetpartikel zusammen mit den Zielzellen mithilfe eines außerhalb des Reaktionsgefäßes befindlichen Magneten abgetrennt. Auch hier ist die Verschleppung unspezifisch anhaftender Zellen an die Magnetpartikel eine erhebliche Einschränkung des Verfahrens hinsichtlich der Reinheit der Zielfraktion.

Beim Fluoreszenz-aktivierten Trennen von Zellen (FACS) werden

diese in einem Flüssigkeitsstrom durch eine dünne Kapillare transportiert, wobei in der Regel noch ein weiterer, zellfreier Hüllstrom vorgesehen ist. Dieser Strom wird von einem Tropfengenerator in Einzeltropfen zerlegt, die aus der Kapillare in einen freien Meßraum emittiert werden. Die Tropfen passieren im Flug eine optische Meßstrecke, in der sie einer Streulicht- und/ oder Fluoreszenzlichtmessung unterzogen werden. Hierzu werden ein oder mehrere Laser auf die Flugbahn der Tropfen in der optischen Meßfläche fokussiert. Die gemessenen Streulicht- und/oder Fluoreszenzintensitäten erlauben die Feststellung, ob bestimmte Zelleneigenschaften gegeben sind oder nicht. In Abhängigkeit vom Meßergebnis wird eine nach der Meßstrecke angeordnete Verteilereinrichtung, zum Beispiel auf der Basis einer mechanischen Prallplatte oder einer elektrostatischen Ablenkvorrichtung, betätigt.

Der Nachteil der fluoreszenzaktivierten Zelltrennung besteht darin, daß es sich um ein serielles Verfahren handelt. Der optische Aufwand für die Meßstrecke ist so groß, daß eine Parallelisierung für praktische Anwendungen zu aufwendig ist. Entsprechendes gilt für die Tropfenerzeugung und die Verteilereinrichtung. Um beispielsweise 10000 Zellen pro Sekunde analysieren zu können, muß bei einer seriellen Verfahrensweise die Meßzeit auf 100 ms oder weniger beschränkt werden. In derart kurzen Zeitbereichen sind Messungen zwar möglich, aber auch mit relativ großen Fehlern behaftet, so daß die Trennschärfe des Verfahrens negativ beeinflußt wird.

Die mikroskopische Zelltrennung basiert darauf, eine zweidimensionale Schicht von Zellen (sogenannter Zellrasen) zu bilden und mit einem Mikroskop abzurastern. Von jeder Zelle wird ein Bild aufgenommen, das einer Bildauswertung zur Feststellung vorbestimmter Zelleigenschaften unterzogen wird. Je nach dem Auswertungsergebnis wird eine Pickvorrichtung dazu verwendet, einzelne Zellen nach der Messung aus dem Zellrasen zu lö-

sen und einem Zielort zuzuführen. Eine besonders hohe Auflösung bei der Bildaufnahme wird durch Einsatz der konfokalen Mikroskopie erzielt. Auch dieses Verfahren besitzt Beschränkungen vor allem in bezug auf den Durchsatz der Pickvorrichtung. Ohne Zellen zu beschädigen, kann maximal im Rhythmus von ca. 10 s jeweils ein Pickvorgang erfolgen, der darüber hinaus eine mechanische Belastung der zu trennenden Zellen darstellt.

Die genannten Probleme treten nicht nur bei der Trennung von Zellgemischen, sondern allgemein bei der Trennung von Partikelgemischen natürlichen und/oder synthetischen Ursprungs auf.

In Fig. 7 ist ein aus der Mikrosystemtechnik allgemein bekanntes Prinzip der Verteilung von Partikeln illustriert. Ein fluidisches Mikrosystem 100' enthält eine erste Kanalstruktur 10' und eine zweite Kanalstruktur 20', die aneinandergrenzende, zum Beispiel nebeneinander oder übereinander angeordnete, Kanäle oder Kammern umfassen. Ein in einer Flüssigkeit suspendiertes Partikelgemisch 1' wird in der ersten Kammerstruktur 10' zu einem Feldkäfig 30' bewegt. Sobald ein Partikel im Feldkäfig 30' positioniert ist, erfolgen an dieser Beobachtungsposition eine Vermessung des Partikels mit elektrischen Mitteln und nach Freigabe des Partikels vom Feldkäfig 30' in Abhängigkeit vom Meßergebnis eine Ansteuerung einer Ablenkelektrode 40' derart, daß der Partikel in die zweite Kanalstruktur 20' überführt oder zur weiteren Bewegung in der ersten Kanalstruktur 10' verbleibt (siehe Pfeile). Dieses Verfahren ist wegen der seriellen Trennweise nachteilig. Soll das Trennverfahren gemäß Fig. 5 mit mehreren Feldkäfigen durchgeführt werden, so müßten entsprechend mehrere Ablenkelektroden selektiv verstimmt werden. Dies ist jedoch wegen der elektrischen Wechselwirkung benachbarter Strukturen in praktisch interessierenden Zeitbereichen nicht zuverlässig durchführbar und es würde zu unerwünschten Fehltrennungen kommen. Ein weiterer Nachteil besteht in der Beschränkung auf die Messung

elektrischer Eigenschaften der Partikel im Mikrosystem.

Der Einsatz von optischen Kräften zur Trennung von Partikelgemischen ist an sich bekannt (siehe Buican et al. in "Applied Optics", Bd. 26, 1987, S. 5311 ff. und Fuhr et al. in "Topics in Current Chemistry" Springer-Verlag 1998, S. 83 ff.). Allerdings sind die herkömmlichen Techniken auf Trennungen mit einem sehr geringen Partikeldurchsatz beschränkt, da der Sortiervorgang nur an einer einzigen definierten Position durchgeführt wird und alle Partikel nacheinander diese Position durchlaufen. Außerdem ist die Reproduzierbarkeit der optischen Bewertung der Partikel vor der Trennung nur über optische Kräfte ohne eine zusätzliche Positionskontrolle der Partikel nur schwer möglich.

Die Aufgabe der Erfindung ist es, ein verbessertes Trennverfahren anzugeben, das sich durch einen hohen Durchsatz, eine hohe Trennschärfe und eine geringe mechanische Belastung der zu trennenden Partikel auszeichnet. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, eine Trennvorrichtung zur Implementierung eines derartigen Verfahrens anzugeben.

Diese Aufgaben werden durch ein Verfahren und eine Vorrichtung mit den Merkmalen gemäß den Patentansprüchen 1 bzw. 23 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Anwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Die Grundidee der Erfindung besteht darin, eine Partikeltrennung in einem fluidischen Mikrosystem durchzuführen, in dem die zu trennenden Partikel zunächst einzeln oder gruppenweise in mindestens einer Aufnahmestruktur an einer Vielzahl von Funktionselementen, die zum mindestens zeitweiligen Haltern der Partikel oder Partikelgruppen eingerichtet sind, insbesondere Funktionselementen auf der Basis von Feldkäfigen oder anderen geeigneten Feldbarrieren durch positive oder negative

Dielektrophorese positioniert und an dieser Beobachtungsposition (oder: in diesem Beobachtungsfeld) vermessen werden. Beim Vermessen werden vorbestimmte Eigenschaften der zu trennenden Partikel und dementsprechend die Positionen der Partikel ermittelt, die aus dem Gemisch zu trennen sind oder die Positionen der Partikel, die zum Restgemisch gehören. Im Rahmen der vorliegenden Beschreibung werden die abzutrennenden Partikel auch Zielpartikel und die zum übrigen Gemisch gehörenden Partikel Restpartikel genannt. Unter zeitweiligem Halten wird hier eine Positionierung der Partikel an einem vorbestimmten Ort im Mikrosystem für die Dauer der jeweiligen Messung oder Manipulation verstanden.

Um die Ziel- oder Restpartikel in eine benachbarte Kanalstruktur des Mikrosystems zu übertragen, werden die Ziel- oder Restpartikel nach der Vermessung sukzessiv oder gleichzeitig einer Laserbestrahlung zur Bildung von optischen Käfigen unterzogen. Vorzugsweise werden die Ziel- oder Restpartikel nach der Vermessung gleichzeitig einer Laserbestrahlung zur Bildung von optischen Käfigen unterzogen. Die Laserbestrahlung kann hierbei z.B. innerhalb eines Feldkäfigs, an einer Feldbarriere oder in Fließrichtung unmittelbar hinter einem Feldkäfig oder einer Feldbarriere erfolgen. Dementsprechend werden die Ziel- oder Restpartikel zusätzlich zu den elektrischen Feldkräften auch optischen Kräften ausgesetzt. Je nach Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Übertragung der Ziel- oder Restpartikel durch Verschiebung der optischen Käfige in die benachbarte Kanalstruktur oder durch Öffnen der elektrischen Feldkäfige hin zur benachbarten Kanalstruktur bei gleichzeitigem Festhalten der optischen Käfige. Diese Übertragung erfolgt vorzugsweise für mehrere Ziel- oder Restpartikel gleichzeitig. Die Zielpartikel werden entsprechend in der benachbarten oder in der ursprünglichen Kanalstruktur des Mikrosystems gesammelt und weiter bearbeitet. Es können auch Gruppen von Partikeln aus den Beobachtungsfeldern über-

tragen werden.

Gemäß einer Grundform der Erfindung erfolgt ein Verteilen der Ziel- und Restpartikel in zwei Gruppen. Die Ziel- und Restpartikel können eine oder mehrere Arten von Partikeln umfassen. Durch stufenweises Wiederholen der Trennung jeweils unter Bezug auf andere Partikeleigenschaften kann auch ein Sortieren in mehrere Ziel- und Restpartikelgruppen erfolgen. Die Ziel- oder Restpartikel 2, 3 werden nach der Trennung vorzugsweise in verschiedene Auffangbehälter überführt.

Eine Vorrichtung zur Partikeltrennung in fluidischen Mikrosystemen umfaßt insbesondere eine oder mehrere erste Aufnahmestruktur(en) mit Einrichtungen zum mindestens zeitweiligen Haltern der Partikel, insbesondere mit Elektrodeneinrichtungen zur Bildung einer Vielzahl von Funktionselementen (z.B. dielektrische Feldkäfige), eine oder mehrere insbesondere benachbarte, zweite Aufnahmestruktur(en), die jeweils mit der ersten oder den ersten Aufnahmestruktur(en) über Öffnungen verbunden ist oder sind, vorzugsweise an den Positionen der Funktionselemente, eine oder mehrere Lasereinrichtung(en), die zur Bildung eines oder mehrerer optischer Käfige an jedem Funktionselement, insbesondere in jedem dielektrischen Feldkäfig, ausgebildet ist oder sind, und einen oder mehrere Lichtmodulator(en), mit dem oder denen in jeder vorgegebenen Position der einzelne oder mehrere optische Käfige ein- oder ausgeschaltet werden kann oder können. Vorzugsweise können die optischen Käfige einzeln ein- oder ausgeschaltet werden. Des weiteren ist es bevorzugt, jeweils einen optischen Käfig an jedem Funktionselement zu bilden. Vorzugsweise weist die Vorrichtung eine oder mehrere Ladeeinrichtung(en) zum Positionieren von Partikeln an den Funktionselementen auf.

Die Aufnahmestrukturen sind insbesondere Kanal- oder Kammerstrukturen des fluidischen Mikrosystems. Die Öffnungen zwi-

schen den Aufnahmestrukturen können mit Klappen zeitweilig verschließbar ausgebildet sein.

Gemäß einer ersten Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Übertragung der Zielpartikel durch Einschalten der optischen Käfige in oder hinter den Feldkäfigen oder Feldbarrieren mit den Zielpartikeln, Einfangen der Zielpartikel in den optischen Käfigen und Verschieben der optischen Käfige in die zweite Kanalstruktur, während die Restpartikel in der ersten Kanalstruktur bleiben. Die zweite Kanalstruktur liegt dabei entweder in y-Richtung parallel seitlich zu der ersten (relativ zur Fließrichtung des Partikelstroms) versetzt. In diesem Fall geschieht das Verschieben der in den optischen Käfigen gehaltenen Partikel durch Verschieben der Vorrichtung in xy-Richtung relativ zur optischen Achse des Laserstrahls. Oder die zweite Kanalstruktur liegt in z-Richtung entlang der optische Achse über der ersten Kanalstruktur. In diesem Fall geschieht das Verschieben der Partikel in die zweite Ebene durch Fokusverstellung der optischen Käfige.

Gemäß einer zweiten Ausführungsform der Erfindung werden die Zielpartikel ebenfalls in den jeweiligen dielektrischen Feldkäfigen in optischen Käfigen gehalten, während die Restpartikel in den übrigen dielektrischen Feldkäfigen unbeleuchtet und somit frei von optischen Kräften bleiben. Zur Partikeltrennung werden sämtliche Feldkäfige derart verstimmt, daß dielektrische Abstoßungskräfte ausgebildet werden, die auf die Partikel in den Feldkäfigen hin zu der zweiten Kanalstruktur gerichtet sind. Darauf hin werden die Restpartikel in die zweite Kanalstruktur übertragen, während die Zielpartikel unter Wirkung der optischen Kräfte trotz der Feldkäfigverstimmung in der ersten Kanalstruktur verbleiben.

Ein wesentliches Merkmal der Erfindung besteht in einer Kombination von parallelisierten Haltekräften, insbesondere elekt-

rischen Feldkräften, zur Positionskontrolle mit parallelisierten optischen Kräften zur Sortierung. Beliebige Positionen in der erfindungsgemäßen Vorrichtung können durch den speziellen optischen Aufbau mit der Laserbestrahlung gleichzeitig adressiert werden, ohne die Vorrichtung zu bewegen. Die Kombination mit vervielfältigten Feldkäfigen sieht die gleichzeitige Beobachtung und Bewertung einer großen Anzahl von Partikeln vor, die z.B. durch dielektrische Kräfte an vorbestimmten Positionen gehalten werden. Anschließend wird der Sortiervorgang durch die parallelisierte und adressierbare Laserbestrahlung für diese große Anzahl an Partikeln vorzugsweise in einem Schritt, d.h. gleichzeitig, vorgenommen. So wird ein hoher Durchsatz beim Sortieren ermöglicht. Das Ausbilden optischer Käfige an den Beobachtungsfeldern erfolgt über eine parallelisierte Optik zur gleichzeitigen Adressierung aller gewünschten Beobachtungsfelder.

Die Erfindung besitzt die folgenden Vorteile. Mit dem erfindungsgemäßen Prinzip des gleichzeitigen oder sukzessiven Vermessens einer Vielzahl von Partikeln mit einer anschließenden gleichzeitigen oder sukzessiven Übertragung der Zielpartikel wird der Durchsatz der Partikeltrennung im Vergleich zu den herkömmlichen Techniken erheblich erhöht. Vorzugsweise erfolgt die Übertragung der Zielpartikel gleichzeitig. Die Vermessung der Partikel z. B. in den dielektrischen Feldkäfigen kann schonend ohne nachteilige Auswirkungen auf die Partikel durchgeführt werden. Für die Vermessung steht genügend Zeit zur Verfügung, um die jeweils gesuchten Eigenschaften der Partikel zuverlässig zu ermitteln. Insbesondere das Aussortieren von selten vorkommenden Partikeln in einer großen Ausgangspopulation kann so mit hoher Zuverlässigkeit erfolgen, da alle Partikel einzeln adressierbar sind. Die dielektrischen Feldkäfige oder Feldbarrieren trennen die einzelnen Partikel oder Gruppen von Partikeln während der Prozedur räumlich voneinander. Die optischen Käfige ermöglichen ein Erfassen einzelner Partikel

ohne Übersprechen auf andere Partikel. Damit wird die Trennschärfe der Partikeltrennung erheblich verbessert. Die Vermessung kann sich auf elektrische und/oder optische Eigenschaften der Partikel beziehen. Die Erfindung ist mit beliebigen Partikeln natürlichen oder synthetischen Ursprungs implementierbar, die in fluidischen Mikrosystemen manipulierbar sind. Ein weiterer Vorteil besteht in der Kompatibilität des Trennverfahrens mit der verfügbaren Mikrosystemtechnik.

Weitere Vorteile und Einzelheiten der Erfindung werden aus der folgenden Beschreibung der beigefügten Zeichnungen ersichtlich. Es zeigen:

- Fig. 1 eine schematische Draufsicht eines Mikrosystems mit einer erfindungsgemäßen Trennvorrichtung,
- Fig. 2 eine schematische Seitenansicht eines Mikrosystems gemäß Fig. 1,
- Fig. 3 eine schematische Draufsicht eines Mikrosystems mit einer weiteren erfindungsgemäßen Trennvorrichtung,
- Fig. 4A eine schematische Seitenansicht auf ein Mikrosystem gemäß Fig. 3 mit übereinander gelagerten Kanälen,
- Fig. 4B eine schematische Draufsicht eines Mikrosystems mit nebeneinander gelagerten Kanälen,
- Fig. 5 eine schematische Draufsicht eines Mikrosystems mit einer zweidimensionalen, flächigen Matrixanordnung von Feldkäfigen und einem für die erfindungsgemäße Ausführung typischen Strömungsprofil,

Fig. 6 eine schematische Draufsicht eines Mikrosystems mit einer zweidimensionalen, flächigen Matrixanordnung von Feldbarrieren, und

Fig. 7 eine schematische Draufsicht auf einen herkömmlichen Einzelpartikelverteiler (Stand der Technik).

Eine erste Ausführungsform der Erfindung, die in den Figuren 1 und 2 illustriert ist, basiert auf der Kombination von dielektrischen Feldkäfigen mit verstellbaren optischen Käfigen. Eine erfindungsgemäße Trennvorrichtung 200, die in ein fluidisches Mikrosystem 100 integriert ist, umfaßt eine Vielzahl dielektrischer Feldkäfige 30, in denen mit der Lasereinrichtung 40 und der Optik 42 jeweils ein optischer Käfig mit verstellbarem Fokus 41 gebildet ist. Das Bezugszeichen 43 weist auf einen Lichtmodulator, mit dem die optischen Käfige in den Feldkäfigen 30 selektiv ein- oder ausgeschaltet werden können.

Die Erzeugung optischer Käfige und deren Verwendung zur Manipulierung mikroskopisch kleiner Partikel ist an sich bekannt (s. z.B. A. Ashkin et al. in "Nature", Bd. 330, 1987, S. 796 ff., und G. Weber et al. in "International Review of Cytology", Bd. 133, 1992, S. 1 ff.). Einzelheiten des Laserbetriebs (z.B. Leistung, Wellenlänge etc.) und der Strahlfokussierung können bei der Realisierung des erfindungsgemäßen Systems auf der Grundlage der bekannten Techniken an die konkrete Trennaufgabe angepaßt werden.

Das Mikrosystem 100 umfaßt mindestens zwei Kanalstrukturen 10, 20. Die Kanalstrukturen 10, 20 umfassen jeweils Mikrokanäle oder Mikroammern, z. B. offene Reservoirs oder Vertiefungen wie in Nano- oder Mikrotiterplatten, mit anwendungsabhängig gewählter Gestalt. Es sind auch Kombinationen aus Mikrokanälen und Mikroammern in einem Mikrosystem möglich. Vorzugsweise sind Mikrokanäle vorgesehen. Beim dargestellten

Beispiel sind beispielsweise zwei in Betriebsfunktion übereinander angeordnete Kanäle vorgesehen. Sie können aber auch nebeneinander angeordnet sein (siehe Figur 4B). Die Kanäle sind unter anderem aus Kunststoff-, Glas oder Halbleitermaterialien mit aus der Mikrosystemtechnik an sich bekannten Verfahren hergestellt und dazu ausgelegt, von Flüssigkeiten mit suspendierten Partikeln durchströmt zu werden. Vorzugsweise werden die in einer Flüssigkeit suspendierten Partikel mit einem Flüssigkeitstransportsystem durch das Mikrosystem befördert. Die Kanäle besitzen charakteristische Dimensionen, die in Abhängigkeit von der Anwendung so gewählt sind, daß ein unbehinderter Suspensionsdurchsatz möglich ist. Dient das Mikrosystem beispielsweise der Manipulierung biologischer Zellen (charakteristische Größe: 10 μm), so besitzt jeder Kanal einen typischen Querschnitt, der größer als 10 μm ist und beispielsweise bis zu 50 μm beträgt. Zum Trennen synthetischer Partikel (beads), zum Beispiel bei Anwendungen in der kombinatorischen Chemie, können die Kanäle aber auch charakteristische Querschnittsdimensionen im Bereich von 100 bis 200 μm besitzen. Um eine optische Partikelvermessung in den Feldkäfigen zu gewährleisten, werden die Wände des Mikrosystems 100 entsprechend mindestens teilweise transparent gestaltet.

In der ersten Kanalstruktur 10 des Mikrosystems 100 ist eine Vielzahl von Feldkäfigen 30 gebildet. Jeder Feldkäfig 30 umfaßt eine Gruppe von schematisch dargestellten Mikroelektroden 31, die an den Deck- und Bodenflächen der jeweiligen Kanalstruktur angebracht sind. Die Mikroelektroden 31 sind dazu ausgelegt, mit Hochfrequenzfeldern derart beaufschlagt zu werden, daß sich zwischen den Mikroelektroden 31 eine Feldverteilung ergibt, in der auf dielektrische Partikel Polarisationskräfte erzeugt werden, die die Partikel im Inneren des Feldkäfigs halten. Einzelheiten des Aufbaus und der Ansteuerung von dielektrischen Feldkäfigen und Feldbarrieren sind an sich be-

kannt (s. z.B. G. Fuhr et al. in "Electromanipulation of Cells", CRT Press Inc., 1996, S. 259 ff.).

Im Mikrosystem 100 ist ferner vorzugsweise eine Ladeeinrichtung 50 vorgesehen, die zur Verteilung von Partikeln auf die Feldkäfige 30 der Trennvorrichtung 200 ausgelegt ist. Mit besonderem Vorteil wird eine Ladeeinrichtung 50 verwendet, deren Funktion im einzelnen unten erläutert wird. Diese Form der Ladeeinrichtung stellt jedoch kein zwingendes Merkmal der Erfindung dar und kann alternativ auch durch andere Lade- oder Aufreihglieder ersetzt werden. Es können auch mehrere Ladeeinrichtungen vorgesehen sein.

Die Beladung der Beobachtungspositionen oder -felder kann beispielsweise auch passiv durch Transport der Partikelsuspension über den laminaren Flüssigkeitsstrom vorgenommen werden. Das Strömungsprofil in den Mikrokanälen der Vorrichtung ist nicht parabolisch, sondern verläuft über den größten Teil des Kanals - mit Ausnahme der äußersten Randbereiche - geradlinig (siehe Fig. 5), da der Kanal erheblich breiter ist, als hoch. So werden die Partikel über den größten Teil des Kanals gleichmäßig schnell transportiert und die Feldkäfige oder Feldbarrieren werden statistisch gleichmäßig beladen. Ablenkelektroden 63 am Rand des Kanals dienen dazu, Partikel aus den strömungsberuhigten Randzonen des Kanals in Zonen mit gleichförmiger Strömung zu befördern. Die Ablenkelektroden können dabei auch Teil von Feldkäfig- oder Feldbarrieren-elektroden sein. Sollte eine Beobachtungsposition einmal unbesetzt bleiben, ist dies für das weitere Verfahren unerheblich.

Die Kanalstrukturen 10, 20 sind, abgesehen von Öffnungen 11 im Bereich jedes Feldkäfigs 30, durch eine durchgehende Wandung voneinander getrennt. Die Aufgabe des Trennverfahrens besteht nun darin, ein in der ersten Kanalstruktur 10 entsprechend der

Pfeilrichtung A eingeströmtes Partikelgemisch 1 in Zielpartikel 2, die bei dieser Ausführungsform der Erfindung in die zweite Kanalstruktur 20 übertragen werden sollen, und Restpartikel 3 zu trennen, die in der ersten Kanalstruktur 10 verbleiben sollen. So werden zunächst die Partikel einzeln oder gruppenweise, z.B. unter Verwendung der Ladeeinrichtung 50, in die in einer Reihe (siehe Fig. 1) angeordneten Beobachtungspositionen (Feldkäfige oder Feldbarrieren) 30 geladen. Die Ladeeinrichtung 50 umfaßt beispielweise zwei gerade, an den oberen und unteren Kanalseiten angeordnete, streifenförmige Mikroelektroden, die bei Beaufschlagung mit hochfrequenten elektrischen Feldern unter Wirkung negativer Dielektrophorese Abstoßungskräfte auf die anströmenden Teilchen ausüben und damit eine schräg zur Strömungsrichtung (Pfeil A) verlaufende Feldbarriere bilden. Hier werden beispielhaft einzelne Partikel betrachtet. Die Umsetzung der Erfindung mit Gruppen von Partikeln erfolgt analog. Der erste anströmende Partikel 1a läuft bei eingeschalteter Feldbarriere zunächst entlang der Pfeilrichtung B bis zum Ende der Ladeeinrichtung 50 und dann in den Feldkäfig 30a (siehe Fig. 2). In diesem Zustand ist der Feldkäfig 30a auf der stromaufwärts gelegenen Seite offen, so daß der Partikel frei bis zum Mittelpunkt 31a des Feldkäfigs 30a gelangt. Sobald das Eintreffen des Partikels zum Beispiel mit optischen oder elektrischen Mitteln erfaßt ist, wird der Feldkäfig 30a auch auf der stromaufwärts gelegenen Seite geschlossen. Die übrigen Feldkäfige 30b, 30c, ... werden analog durch Einstromen von Partikeln beladen. Die Ladeeinrichtung 50 wird synchron zum Beladungszustand der Feldkäfige betätigt. An der Ladeeinrichtung 50 sind ggf. weitere Aufreihglieder, Feldkäfige oder Barrieren zur Anordnung der anströmenden Partikel vorgesehen.

Wenn alle Feldkäfige beispielsweise mit einzelnen Partikeln beladen sind, erfolgt die Vermessung zur Bestimmung physikalischer und/oder biologisch-chemischer Parameter der Partikel.

Diese Vermessung erfolgt beispielsweise auf optischem Wege (zum Beispiel Fluoreszenz- oder Streulichtmessung) und/oder auf elektrischem Wege (zum Beispiel Elektrorotationsmessung in den Feldkäfigen). Vorzugsweise wird zu den optischen Messungen eine Lasereinrichtung verwendet, die auch zur Bildung der optischen Käfige ausgelegt ist. Es kann auch vorgesehen sein, mit der Suspensionsflüssigkeit im Mikrosystem Zusatzstoffe zu den Feldkäfigen zu spülen, deren Wechselwirkung mit den gehaltenen Partikeln optisch und/oder elektrisch erfaßt wird. Die Feldkäfige, in denen sich die Zielpartikel mit vorbestimmten Parametern befinden, werden zur Vorbereitung des folgenden Trennschrittes erfaßt.

Zur gleichzeitigen Übertragung der Zielpartikel in die zweite Kanalstruktur 20 wird der Lichtmodulator 43 derart betätigt, daß eine Laserbestrahlung in die erfaßten Feldkäfige mit den Zielpartikeln freigegeben wird. Durch diese Bestrahlung wird jeweils ein optischer Käfig gebildet, dessen Fokus 41 mit dem Zentrum (z.B. 31a) des dielektrischen Feldkäfigs 30 übereinstimmt. Die Zielpartikel werden in den optischen Käfigen wie mit einer Laserpinzette gefangen. Anschließend wird gleichzeitig für alle optischen Käfige der Fokus 41 durch die Öffnung 11 zwischen den Kanalstrukturen (Pfeil C) verschoben. Diese Verschiebung erfolgt beispielsweise durch Verstellung der Optik 42. Sobald die Zielpartikel mit dem verschobenen Fokus in die zweite Kanalstruktur 20 übertragen worden sind, wird mit dem Lichtmodulator 43 die Laserstrahlung abgeschaltet. Dadurch werden die Zielpartikel freigegeben, um einer weiteren Bewegung und/oder Bearbeitung in der zweiten Kanalstruktur 20 unterzogen zu werden. Simultan werden die Feldkäfige 30 in der ersten Kanalstruktur 10 auf der stromabwärts gelegenen Seite geöffnet, so daß die Restpartikel 3 ebenfalls freigegeben werden. Die Ziel- oder Restpartikel 2, 3 können jeweils einer oder mehreren weiteren Trennungen nach dem erläuterten Prinzip unterzogen werden, um eine Sortierung in eine Vielzahl von

Partikelgruppen vorzunehmen.

Die Trennvorrichtung 200 umfaßt insbesondere die Lasereinrichtung 40, deren Licht mit der Optik 42 zur Bildung des Fokus 41 gebündelt wird, und den Lichtmodulator 43. Die Lasereinrichtung 40 umfaßt eine Laserdiodenanordnung oder einen einzelnen Laser mit einer Strahlaufweitungsoptik. Es können auch mehrere Laserstrahlen zur Bildung jeweils eines optischen Käfigs vorgesehen sein. Bei der Laserdiodenanordnung sind eine Vielzahl von Laserdioden entsprechend der Position der Feldkäfige oder Feldbarrieren im Mikrosystem ausgerichtet. Beim Einsatz eines einzelnen Lasers hingegen wird die gesamte Anordnung der Feldkäfige mit dem einzelnen aufgeweiteten Strahl beleuchtet. Die Lasereinrichtung 40 wird vorzugsweise bei einer Wellenlänge betrieben, die sich zur Ausbildung effektiver optischer Käfige bei möglichst geringer Lichtleistung besonders gut eignet. Bei den meisten Anwendungen wird die Wellenlänge im infraroten oder roten Spektralbereich gewählt.

Der Lichtmodulator 43 ist ein Transmissions- oder Reflektions-Modulator. Als Transmissions-Modulator sind an sich bekannte Mikroshutteranordnungen verwendbar, bei denen eine Vielzahl von Mikroshuttern entsprechend der Position der Feldkäfige ausgerichtet ist. Es werden mechanische Mikroshutter oder schaltbare Flüssigkristall-Anordnungen verwendet. Als Reflektions-Modulator kann eine schaltbare Matrix von Spiegelementen (sog. Digital Mirror Array) verwendet werden. Alternativ ist es bei Ausbildung der Lasereinrichtung 40 mit einer Laserdiodenanordnung auch möglich, den Lichtmodulator in die Lasereinrichtung 40 zu integrieren. In diesem Fall ist der Lichtmodulator eine Steuerschaltung, mit der die einzelnen Laserdioden individuell ein- oder ausgeschaltet werden können.

Die Optik 42 umfaßt eine Mikrolinsen-Anordnung aus einer Vielzahl von Mikrolinsen, die vorzugsweise entsprechend den Posi-

tionen der Feldkäfige ausgerichtet sind. Es ist mit der erfindungsgemäßen Optik ferner möglich, mehrere Teilbereiche eines Feldkäfigs parallel zu erfassen und Laserpinzetten auf diese Bereiche zu richten. Dies ist insbesondere von Vorteil, wenn Gruppen von Partikeln in den Feldkäfigen enthalten sind und einzelne Partikel oder Untergruppen aus den Gruppen von Ziel- oder Restpartikeln 2, 3 den Beobachtungsfeldern übernommen werden sollen. An dieser Ausführungsform besteht insbesondere für Anwendungen zur Anreicherung von Partikelarten Interesse. Die Mikrolinsenanordnung ist zur Verstellung des Fokus 41 vertikal beweglich angebracht, wie es an sich von Laserpinzetten bekannt ist.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Vermessung der Partikel in den Feldkäfigen unter Verwendung einer optischen Detektoreinrichtung, die beispielsweise durch einen Array-Detektor auf der Basis von CCD-, CID -(Charge Injection Device), CMOS-, APD -(Avalanche Photodiode) oder PD -(Photodiode) Anordnungen gebildet ist. Die Detektoreinrichtung wird vorzugsweise auf der relativ zur Lasereinrichtung 40 gegenüberliegenden Seite des Mikrosystems 100 angebracht. Die Detektorelemente der Detektoreinrichtung sind vorzugsweise für eine wellenlängenselektive Lichterfassung ausgelegt. Hierzu sind Filtereinrichtungen, die ggf. in die Detektoreinrichtung integriert sind, vorgesehen. Die wellenlängenselektive Messung dient insbesondere der Fluoreszenzmessung an den Partikeln.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung, die ebenfalls mit der in den Figuren 1 und 2 illustrierten Anordnung implementiert werden kann, basiert auf der Kombination optischer Käfige mit verstellbaren dielektrischen Feldkäfigen. Bei dieser Gestaltung werden zunächst, wie oben beschrieben wurde, die Partikel des Ausgangsgemisches 1 in den Feldkäfigen 30 positioniert und vermessen. Um nun die Ziel- und Restpartikel voneinander zu trennen, wird in Abhängigkeit vom Meßergebnis für

eine Gruppe von Feldkäfigen 30, die beispielsweise die Zielpartikel enthält, mit dem Lichtmodulator 43 die Laserbestrahlung freigegeben. Dadurch wird jeder Zielpartikel in einem optischen Käfig gefangen. Zur Trennung der Partikel werden nun sämtliche Feldkäfige 30 derart verstimmt, daß eine resultierende dielektrische Kraft auf die Partikel durch die Öffnung 11 hin in die zweite Kanalstruktur 20 ausgeübt wird. Dieser Kraftwirkung folgen alle Partikel, die nicht zusätzlich durch den optischen Käfig gehalten werden, so daß sich eine entsprechende Sammlung in der zweiten Kanalstruktur 20 ergibt. Die beleuchteten Partikel (z.B. Zielpartikel) bleiben in diesem Fall in der ersten Kanalstruktur 10. Nach Freigabe der optischen und dielektrischen Kräfte werden die Ziel- und Restpartikel in der ersten oder zweiten Kanalstruktur 10, 20 weiter transportiert.

Eine weitere abgewandelte Ausführungsform der Erfindung, die entsprechend einem der beiden oben genannten Kombinationsprinzipien betrieben werden kann, ist in den Figuren 3, 4A und 4B illustriert. Das Mikrosystem 100 enthält wiederum zwei übereinander oder nebeneinander angeordnete Kanalstrukturen 10, 20 mit zumindest teilweise transparenten Kanalwänden. Auf den inneren Deck- und Bodenflächen der Kanalstrukturen sind anwendungsabhängig gestaltete Mikroelektroden zur Erzeugung von Feldkäfigen und/oder Barrieren ausgebildet. Im Unterschied zu der in Fig. 1 gezeigten Feldkäfigreihe umfaßt die Trennvorrichtung 200 bei dieser Ausführungsform eine flächige Matrixanordnung von Feldkäfigen 30 in geraden Reihen und Spalten. So sind mehrere Reihen von Beobachtungspositionen in Strömungsrichtung hintereinander angeordnet. Dies hat einerseits den Vorteil, daß individuelle Partikel mehrmals hintereinander bewertet werden können, was die Zuverlässigkeit der Analyse und damit auch der Trennung beträchtlich verbessert. Auf der anderen Seite erhöht ein solches zweidimensionales Array an Beobachtungsfeldern erheblich den Durchsatz an Partikeln, die

gleichzeitig bewertet werden. Die Kanäle können übereinander oder nebeneinander angeordnet sein, wie dies in den Figuren 4A und 4B illustriert ist.

Eine weitere abgewandelte Ausführungsform der Erfindung hinsichtlich der Form der Elektroden zur Ausbildung von Feldkäfigen 60 zeigt die Figur 5. Hier werden die einzelnen Feldkäfige durch Zinken- oder Kamm-artige Elektroden (61a, 61b, 61c...) gebildet. Die Partikel 62a, 62b, 62c... ordnen sich in einer solchen Anordnung in den Zwischenräumen der Zinken an. Diese Elektrodenform hat vor allem Vorteile hinsichtlich einer einfachen Elektrodenprozessierung mit verbundenen Zuleitungen.

Eine weitere Abwandlung der Erfindung ist in Figur 6 demonstriert. Hier werden keine vollständigen Feldkäfige geformt, sondern Feldbarrieren 70 mithilfe von Elektroden, wie bei 70a, 70b, 70c... gezeigt. Die Partikel 71a, 71b, 71c... werden durch einen stetigen Flüssigkeitsstrom 72 gegen die dielektrischen Feldbarrieren gedrückt und so an den jeweiligen Beobachtungspositionen gehalten.

Erfindungsgemäß können verschiedene Richtungen der Bestrahlung durch die Lasereinrichtung 40 vorgesehen sein. Gemäß Fig. 4A erfolgt die Bestrahlung von der Unterseite des Mikrosystems, d.h. von der Seite der ersten Kanalstruktur 10 her. Dementsprechend besteht mindestens der Kanalboden 12 aus einem transparenten Material. Eine optische Vermessung der in den Feldkäfigen 30 gefangenen Partikel kann ebenfalls von der Unterseite des Mikrosystems 100 her oder auch von der entgegengesetzten Seite her erfolgen. Das Licht von der Lasereinrichtung 40 wird wiederum über einen Lichtmodulator 43 und über eine Optik 42 in die Feldkäfige 30 fokussiert.

Bei der in den Figuren 3 und 4A,B gezeigten Ausführungsformen

20

ist als Ladeeinrichtung 50 eine Aufreihung von Feldkäfigen vorgesehen. Die in der ersten Kanalstruktur 10 anströmenden Partikel 1 (zu trennendes Gemisch) werden zunächst in der Ladeeinrichtung 50 positioniert. Sobald jeder Feldkäfig 51 der Ladeeinrichtung 50 einen Partikel enthält, wird die gesamte Reihe der Feldkäfige 51 und die benachbarte Reihe der Feldkäfige 30a so angesteuert, daß die Partikel in die Feldkäfige 30a übernommen werden. Anschließend werden die Feldkäfige 51 der Ladeeinrichtung 50 erneut beschickt. Wiederum werden die Partikel an die Feldkäfige 30a und von dieser zur Reihe der Feldkäfige 30b weitergegeben, bis schrittweise alle Reihen der Feldkäfige 30 gefüllt sind. Anschließend erfolgt die Vermessung und die Trennung der Partikel nach den oben erläuterten Prinzipien.

Ein wichtiger Vorteil der in den Figuren 1 bis 6 gezeigten Ausführungsformen der Erfindung besteht darin, daß sämtliche dielektrischen Feldkäfige gleichzeitig angesteuert werden. Dadurch werden Störfelder oder ein Übersprechen zwischen den Feldkäfigen vermieden, wodurch die Genauigkeit der erfindungsgemäßen Trennung insbesondere im Vergleich zu der unter Bezug auf Fig. 7 erläuterten herkömmlichen Technik erheblich verbessert wird.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Partikeltrennung ausschließlich unter der Wirkung optischer Kräfte. Bei dieser (nicht dargestellten) Ausführungsform werden die zu trennenden Partikel nicht in dielektrischen Feldkäfigen, sondern an mechanisch ausgebildeten Halterungen im Mikrosystem positioniert. Derartige Halterungen werden beispielsweise durch Löcher in der Kanalwandung gebildet. Nach der Partikelvermessung wird die Gruppe der Zielpartikel in entsprechende optische Käfige aufgenommen und mit diesen von den Halterungen weg in die benachbarte Kanalstruktur gehoben.

Bei einer weiteren Abwandlung des oben erläuterten Trennprinzips ist vorgesehen, daß drei Kanalstrukturen zueinander benachbart angeordnet sind, wobei das Positionieren und Vermessen der Partikel in der mittleren Kanalstruktur und das Übertragen von Zielpartikeln in die benachbarten Kanalstrukturen erfolgt, indem zunächst eine erste Gruppe von Zielpartikeln z.B. in die obere Kanalstruktur und anschließend eine weitere Gruppe von Zielpartikeln in die untere Kanalstruktur übertragen wird.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden die Partikel durch mechanische oder akustische Kräfte gehalten oder positioniert. Derartige Halterungen können z. B. mit Mikromanipulatoren oder Ultraschalleinrichtungen gebildet werden.

Die in der vorstehenden Beschreibung, den Zeichnungen und den Ansprüchen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausgestaltungen von Bedeutung sein.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Partikeltrennung, bei dem aus einem Partikelgemisch (1) aus einer Vielzahl von Partikeln in einem fluidischen Mikrosystem Zielpartikel (2) mit vorbestimmten Partikeleigenschaften von Restpartikeln (3) getrennt werden, mit den Schritten:

- Positionieren von Partikeln des Partikelgemisches (1) in Beobachtungsfeldern an Funktionselementen (30) in mindestens einer ersten Aufnahmestruktur (10) des Mikrosystems (100), wobei die Funktionselemente dazu eingerichtet sind, die Partikel zumindest zeitweilig zu halten,
- Vermessen der Partikel in den Beobachtungsfeldern zur Ermittlung der Partikeleigenschaften und Erfassen der Beobachtungsfelder, die die Zielpartikel (2) oder die Restpartikel (3) enthalten,
- Ausbilden optischer Käfige an den Beobachtungsfeldern, die die Ziel- oder Restpartikel enthalten, unter Verwendung mindestens eines Lichtmodulators, mit dem mindestens ein optischer Käfig ein- oder ausgeschaltet werden kann, und
- gleichzeitiges oder sukzessives Übertragen der Ziel- oder Restpartikel von ihren jeweiligen Beobachtungsfeldern in mindestens eine zweite Aufnahmestruktur (20) des Mikrosystems, wobei optische Kräfte der optischen Käfige und Kräfte der Funktionselemente (30) zusammenwirken.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem die Partikel in den Funktionselementen mechanisch oder akustisch gehaltert werden.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem die Funktionselemente (30) Elektrodenanordnungen aufweisen, mit denen inhomogene elektrische Felder erzeugt werden, die abstoßende oder anziehende dielektrophoretische Kräfte auf die Partikel ausüben,

wobei optische Kräfte der optischen Käfige und dielektrische Polarisationskräfte der Funktionselemente (30) zusammenwirken.

4. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem die Beobachtungsfelder ausschließlich einzelne Zielpartikel (2) oder Restpartikel (3) enthalten.

5. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem die Beobachtungsfelder Gruppen von Zielpartikeln (2) oder Restpartikeln (3) enthalten und beim Übertragen einzelne Partikel oder Untergruppen aus den Gruppen von Zielpartikeln (2) oder Restpartikeln (3) entnommen werden.

6. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Zielpartikel (2) oder Restpartikel (3) aus einem oder mehreren Beobachtungsfeldern gleichzeitig übertragen werden.

7. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem die optischen Käfige einzeln ein- und ausgeschaltet werden.

8. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem zum Übertragen der Partikel die Fokuspunkte (41) der optischen Käfige mit den Ziel- oder Restpartikeln gleichzeitig von der ersten in die zweite Aufnahmestruktur (20) verschoben werden, während die jeweils übrigen Partikel in der ersten Aufnahmestruktur (10) bleiben.

9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 bis 8, bei dem die Funktionselemente als dielektrische Feldkäfige (30) oder Feldbarrieren (70) verwendet werden.

10. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem zum Übertragen der Partikel die dielektrischen Feldkäfige (30) einseitig hin zur zweiten Aufnahmestruktur (20) geöffnet und die Ziel- oder Restpartikel mit den optischen Käfigen in

den dielektrischen Feldkäfigen gehalten werden, während sich die jeweils übrigen Partikel in die zweite Aufnahmestruktur (20) bewegen.

11. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem zum Vermessen der Partikel optische Messungen und/oder elektrische Messungen durchgeführt werden.

12. Verfahren gemäß Anspruch 11, bei dem die optischen Messungen Fluoreszenz- und Streulichtmessungen umfassen.

13. Verfahren gemäß Anspruch 12, bei dem zu den optischen Messungen eine Lasereinrichtung verwendet wird, die auch zur Bildung der optischen Käfige ausgelegt ist.

14. Verfahren gemäß Anspruch 11, bei dem die elektrischen Messungen Elektrorotationsmessungen an den Partikeln umfassen.

15. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem als Lichtmodulator eine Mikroshutteranordnung und/oder eine schaltbare Matrix aus Spiegelementen zur Bildung der optischen Käfige an den jeweils erfaßten Funktionselementen oder dielektrischen Feldkäfigen (30) mit den Ziel- oder Restpartikeln betätigt wird.

16. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Partikel in einer Flüssigkeit suspendiert sind, die mit einem Flüssigkeitstransportsystem durch das Mikrosystem befördert wird.

17. Verfahren gemäß Anspruch 16, bei der als Flüssigkeitstransportsystem eine Spritzenpumpe, eine peristaltische Pumpe, eine Membranpumpe, eine Zahnradschleuse, eine elektroosmotische Pumpe und/oder eine piezoelektrische Pumpe verwendet werden, oder bei der der Flüssigkeitstransport durch hydrostatische

Druckunterschiede zwischen Flüssigkeitsreservoirren erzielt wird.

18. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Partikel Strömungskräften und elektrischen Kräften der Elektrodenanordnungen ausgesetzt sind, um die Partikel aufgereiht und/oder vereinzelt an die Beobachtungsfelder zu führen.

19. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Ziel- oder Restpartikel (2,3) nach der Partikeltrennung in verschiedene Auffangeinheiten überfördert werden.

20. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Partikel synthetische Partikel, biologische Zellen, Zellverbände, Zellbestandteile, Makromoleküle, Makromolekülverbände, Bakterien, Viren, Alginat-Beads oder Verbundpartikel aus synthetischen und natürlichen Teilen umfassen.

21. Verfahren gemäß Anspruch 20, bei dem die Partikel sphärische Polymere (Beads) aus organischem (z.B. Polystyrol, Alginat) oder anorganischem (z.B. Silikagel) Material, eukaryotische oder prokaryotische Zellen, Zellverbände und/oder Aggregate aus diesen umfassen, wobei die Aggregate sowohl aus gleichen als auch unterschiedlichen Spezies bestehen können.

22. Verfahren gemäß Anspruch 21, bei dem die Partikel vor dem Einbringen in das Mikrosystem oder im Mikrosystem mit einer Sondensubstanz, insbesondere einer magnetischen, radioaktiven oder einer fluoreszierenden Sondensubstanz, markiert werden.

23. Trennvorrichtung zum Trennen eines Partikelgemisches (1) aus Zielpartikeln (2) mit vorbestimmten Partikeleigenschaften und Restpartikeln (3) in einem fluidischen Mikrosystem, die umfaßt:

- mindestens eine erste Aufnahmestruktur (10) mit einer Vielzahl von Funktionselementen (30), wobei die Funktionselemente Einrichtungen zum zumindest zeitweiligen Haltern der Partikel aufweisen,
- mindestens eine zweite Aufnahmestruktur (20), die jeweils mit der ersten oder den ersten Aufnahmestruktur(en) (10) über Öffnungen (11) verbunden ist,
- mindestens eine Lasereinrichtung (40), die zur Bildung mindestens eines optischen Käfigs an jedem Funktionselement (30) ausgelegt ist, und
- mindestens einen Lichtmodulator (43), mit dem einzelne oder mehrere optische Käfige an den Funktionselementen (30) ein- oder ausgeschaltet werden können.

24. Trennvorrichtung gemäß Anspruch 23, bei der die Öffnungen (11) an den Positionen der Funktionselemente (30) angeordnet sind.

25. Trennvorrichtung gemäß Anspruch 23 oder 24, die mindestens eine Ladeeinrichtung (50) zum Positionieren von Partikeln des Partikelgemisches (1) an den Funktionselementen (30) aufweist.

26. Trennvorrichtung gemäß einem der Ansprüche 23 bis 25, bei der die Funktionselemente (30) durch Halterungen gebildet werden, die mechanische oder akustische Kräfte auf die Partikel ausüben.

27. Trennvorrichtung gemäß einem der Ansprüche 23 bis 25, bei der die Funktionselemente (30) von zinken- oder kammartigen Elektroden gebildet werden.

28. Trennvorrichtung gemäß einem der Ansprüche 23 bis 27, bei der die Funktionselemente (30) Elektrodenanordnungen aufweisen, die zur Erzeugung inhomogener elektrischer Felder eingerichtet sind, mit denen abstoßende oder anziehende die-

lektrophoretische Kräfte auf die Partikel ausgeübt werden können.

29. Trennvorrichtung gemäß einem der Ansprüche 23 bis 28, bei der eine verstellbare Optik (42) vorgesehen ist, mit der die Fokuspunkte (41) der optischen Käfige von den Funktionselementen (30) in der ersten Aufnahmestruktur (10) in die zweite Aufnahmestruktur (20) verstellbar sind.

30. Trennvorrichtung gemäß einem der Ansprüche 23 bis 29, bei der eine Meßvorrichtung zur Ermittlung optischer und/oder elektrischer Partikeleigenschaften vorgesehen ist.

31. Trennvorrichtung gemäß Anspruch 30, bei der die Meßvorrichtung eine Detektoreinrichtung umfaßt, die relativ zur Lasereinrichtung (40) auf der entgegengesetzten Seite des Mikrosystems (100) angeordnet ist.

32. Trennvorrichtung gemäß einem der Ansprüche 23 bis 231 bei der der Lichtmodulator (43) eine Mikroshutteranordnung oder eine schaltbare Matrix von Spiegelementen umfaßt.

33. Trennvorrichtung gemäß einem der Ansprüche 23 bis 32, bei der die Elektrodenanordnungen dielektrische Feldekäfige (30, 60) oder dielektrische Feldbarrieren (70) bilden.

34. Trennvorrichtung gemäß einem der Ansprüche 23 bis 33, die ein Flüssigkeitstransportsystem auf der Basis einer Spritzenpumpe, einer peristaltischen Pumpe, einer Membranpumpe, einer Zahnradpumpe, einer elektroosmotischen Pumpe und/oder einer piezoelektrischen Pumpe aufweist, oder bei der der Flüssigkeitstransport durch hydrostatische Druckunterschiede zwischen den Flüssigkeitsreservoirien erzielt wird.

35. Trennvorrichtung gemäß Anspruch 30, bei dem die Meßvorrichtung einen optischen Array-Detektor auf der Basis eines CCD-, CID (Charge Injection Device)-, CMOS-, APD (Avalanche-Photodiode)- oder PD (Photodiode)-Arrays umfaßt.

36. Trennvorrichtung gemäß Anspruch 35, bei der der Array-Detektor eine Vielzahl von Detektorelementen umfaßt, die zumindest zum Teil mit wellenlängenselektiven Schichten versehen sind.

37. Verwendung eines Verfahrens oder einer Trennvorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche zur Trennung von Partikelgemischen in fluidischen Mikrosystemen.

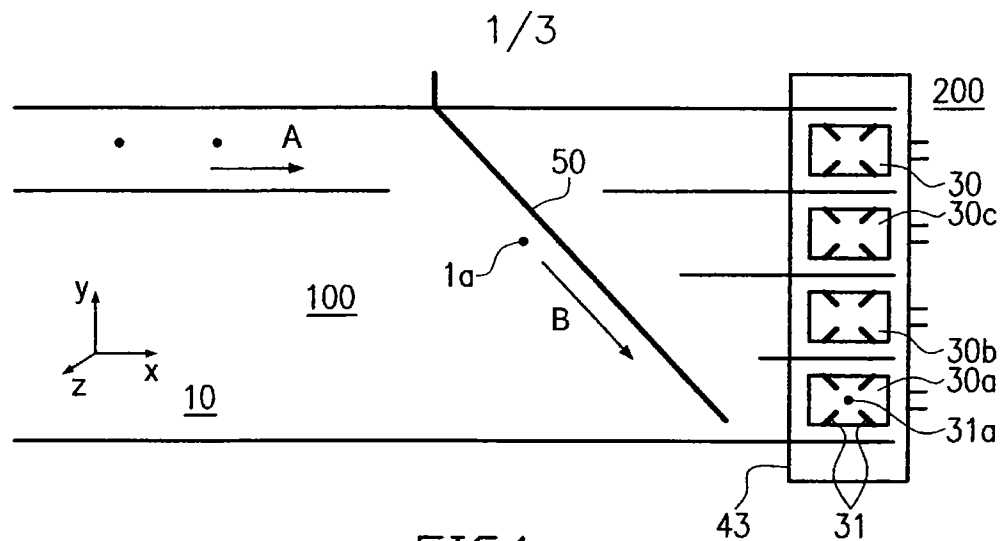


FIG.1

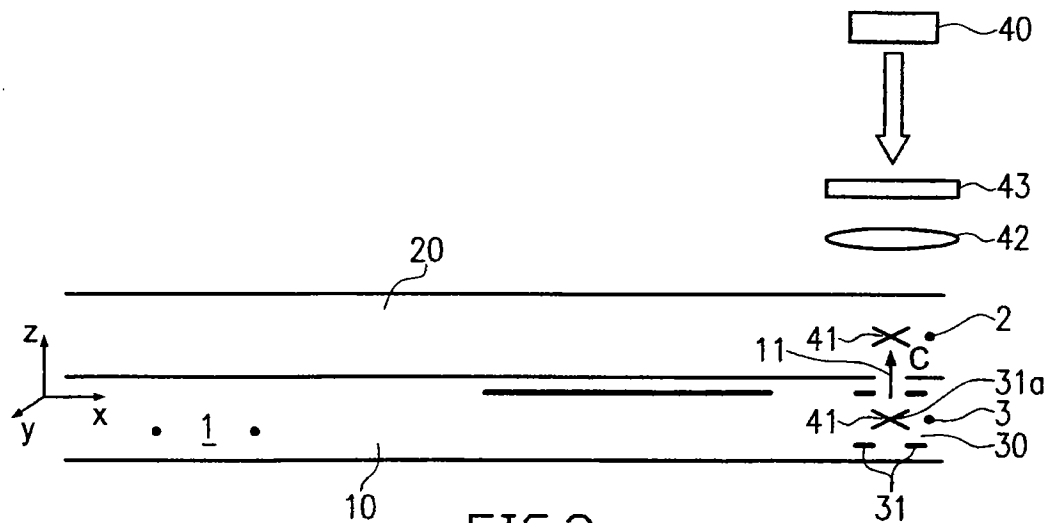


FIG.2

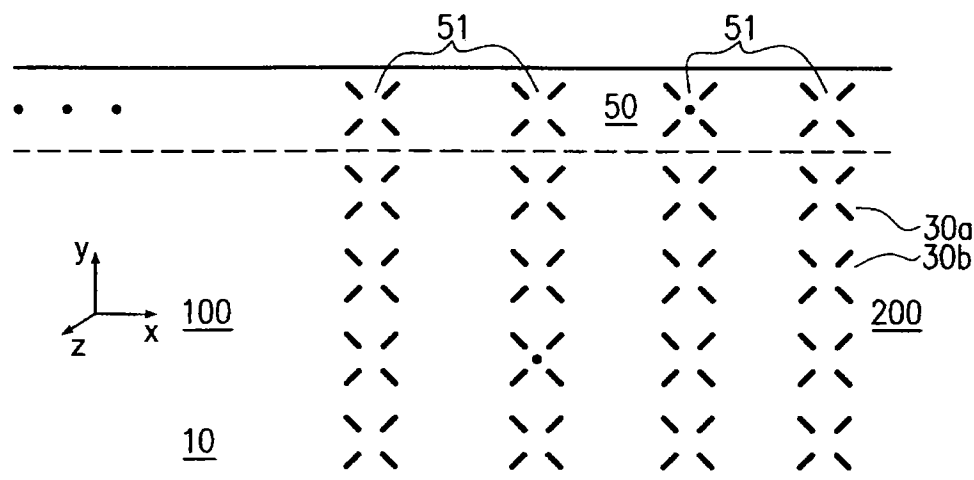
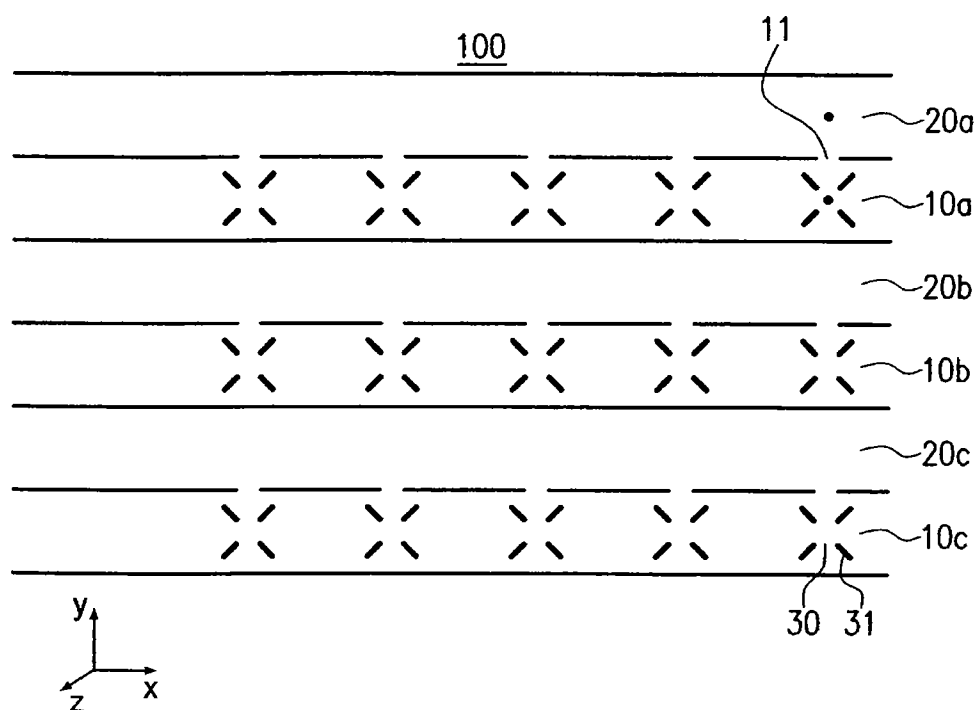
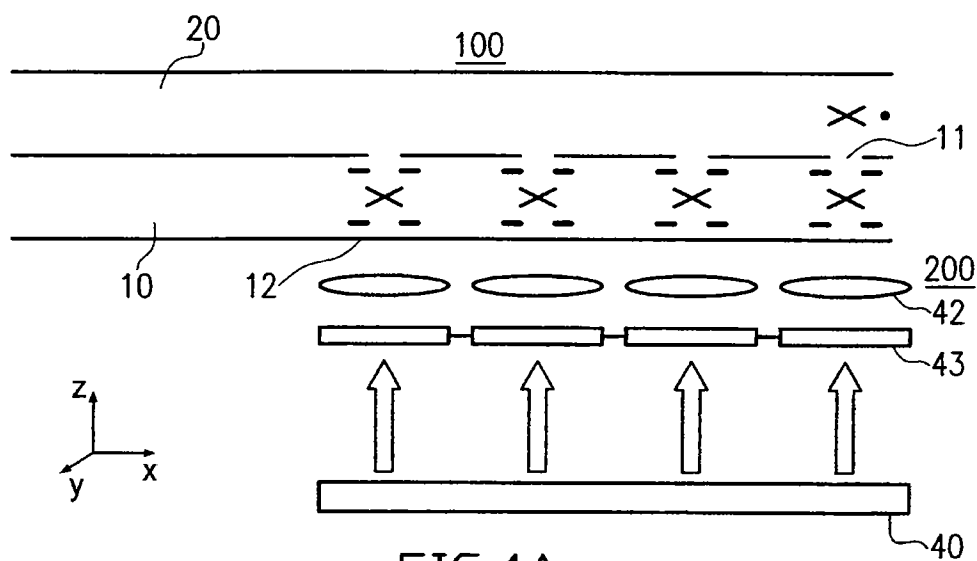


FIG.3

2/3



3/3

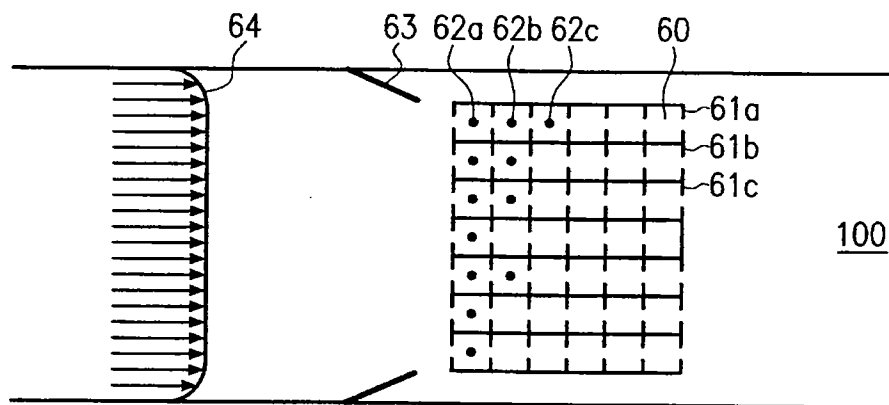


FIG. 5

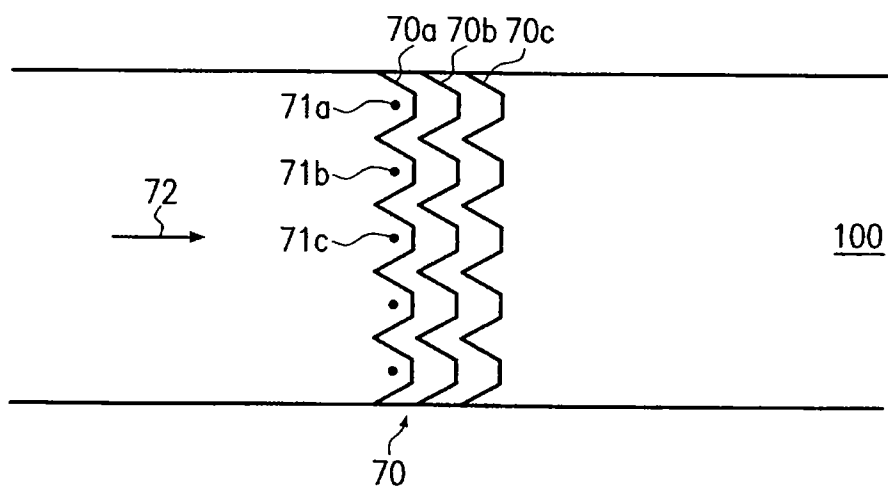


FIG. 6

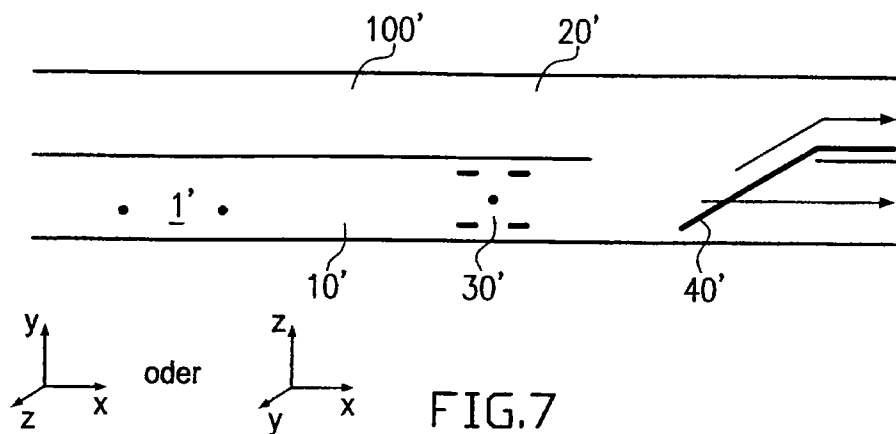


FIG. 7

(Stand der Technik)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

II International Application No
PCT/EP 00/10586

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N15/14 H05H3/04 B03C5/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N H05H B03C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 827 371 A (JAPAN SCIENCE & TECH CORP ;MORITEX CORP (JP)) 4 March 1998 (1998-03-04) column 15, line 10 -column 17, line 45; figures 3,4 ---	1-37
X	EP 0 556 748 A (CANON KK) 25 August 1993 (1993-08-25) column 1, line 27-33; figures 6-9 column 2, line 46 -column 4, line 45 column 7, line 20 -column 13, line 34 --- -/--	1,2,4-8, 11-13, 15-17, 19-26, 29-32, 34-37

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 February 2001

Date of mailing of the international search report

16/02/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Müller, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/10586

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FUHR G ET AL: "CELL HANDLING AND CHARACTERIZATION USING MICRON AND SUBMICRON ELECTRON ARRAYS: STATE OF THE ART AND PERSPECTIVES OF SEMICONDUCTOR MICROTOOLS" JOURNAL OF MICROMECHANICS & MICROENGINEERING, NEW YORK, NY, US, vol. 5, 1995, pages 77-85, XP000912163 ISSN: 0960-1317 the whole document ----	1-37
A,P	FUHR G R ET AL: "Living cells in opto-electrical cages" TRAC, TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY, GB, ANALYTICAL CHEMISTRY. CAMBRIDGE, vol. 19, no. 6, June 2000 (2000-06), pages 402-409, XP004199994 ISSN: 0165-9936 the whole document -----	1-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 00/10586

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0827371 A	04-03-1998	JP 10062332 A US 5952651 A	06-03-1998 14-09-1999
EP 0556748 A	25-08-1993	JP 2714305 B JP 5232398 A AT 172791 T DE 69321748 D DE 69321748 T JP 2756397 B JP 5296914 A US 5495105 A	16-02-1998 10-09-1993 15-11-1998 03-12-1998 17-06-1999 25-05-1998 12-11-1993 27-02-1996

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/10586

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N15/14 H05H3/04 B03C5/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N H05H B03C

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 827 371 A (JAPAN SCIENCE & TECH CORP ;MORITEX CORP (JP)) 4. März 1998 (1998-03-04) Spalte 15, Zeile 10 -Spalte 17, Zeile 45; Abbildungen 3,4	1-37
X	EP 0 556 748 A (CANON KK) 25. August 1993 (1993-08-25) Spalte 1, Zeile 27-33; Abbildungen 6-9 Spalte 2, Zeile 46 -Spalte 4, Zeile 45 Spalte 7, Zeile 20 -Spalte 13, Zeile 34 --- -/--	1,2,4-8, 11-13, 15-17, 19-26, 29-32, 34-37

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. Februar 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

16/02/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Müller, T

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/10586

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
A	<p>FUHR G ET AL: "CELL HANDLING AND CHARACTERIZATION USING MICRON AND SUBMICRON ELECTRON ARRAYS: STATE OF THE ART AND PERSPECTIVES OF SEMICONDUCTOR MICROTOOLS"</p> <p>JOURNAL OF MICROMECHANICS & MICROENGINEERING, NEW YORK, NY, US, Bd. 5, 1995, Seiten 77-85, XP000912163</p> <p>ISSN: 0960-1317</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-37
A,P	<p>FUHR G R ET AL: "Living cells in opto-electrical cages"</p> <p>TRAC, TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY, GB, ANALYTICAL CHEMISTRY. CAMBRIDGE,</p> <p>Bd. 19, Nr. 6, Juni 2000 (2000-06), Seiten 402-409, XP004199994</p> <p>ISSN: 0165-9936</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-37

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

I. Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/10586

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0827371 A	04-03-1998	JP 10062332 A	06-03-1998
		US 5952651 A	14-09-1999
EP 0556748 A	25-08-1993	JP 2714305 B	16-02-1998
		JP 5232398 A	10-09-1993
		AT 172791 T	15-11-1998
		DE 69321748 D	03-12-1998
		DE 69321748 T	17-06-1999
		JP 2756397 B	25-05-1998
		JP 5296914 A	12-11-1993
		US 5495105 A	27-02-1996